

全息胚学说对当前基因工程问题的解决策略 ——多基因获得与期望性状强化技术

王瑞库

(济南市农业高新技术开发区管委会, 济南 250002)

[摘要] 全息胚学说是生命科学的一项重要发现, 给出了全新的生物观。全息胚学说可以解决转基因工程中存在的某些问题, 为生物遗传操作开辟了一条新途径。阐述了建立在全息胚学说基础之上的全息胚基因工程的理论基础、技术原理, 分析了技术的实质和关键, 提出操作方案, 并对其应用前景进行了描述。

[关键词] 全息胚; 基因工程; 解决策略; 多基因获得; 期望性状强化

[中图分类号] Q812 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2006)05-0025-04

全息胚学说是20世纪生命科学的一项重要发现, 给出了新的生物认识^[1,2]。全息生物学是一门新型的交叉学科, 可以解决生物学、医学、农学前沿领域许多重要的疑难问题和理论问题, 如癌的本质是什么? 真核生物DNA重复序列的功能是什么^[3,4]? 等等, 实践上, 在农学、医学、古生物学、园艺学中有重要应用^[5,6]。当前基因工程中如何获得多基因? 基因如何转移? 目标性状如何强化? 全息生物学也给出答案, 提出一种全新的技术方案, 即可以在不了解基因排列顺序的情况下, 得到期望性状基因组合, 通过基因组扩增、遗传转化使期望性状得到强化, 科学地解决了当前多基因转移中的问题, 为生物性状改良开辟了一条崭新的途径。

1 转基因工程中存在的问题

基因工程成为最令人神往、最热门的研究领域之一, 在于从根本上改造生物本体, 创造新品种、新物种, 生产人类所需要的目标物。继1972年世界第一例重组DNA试验成功以后, 1981年美国科学家把外源基因导入小鼠受精卵, 第一次成功地将外源基因导入动物胚胎, 创立了转基因动物技术。

以后相继有兔、绵羊、猪、鱼、昆虫、牛、鸡、山羊、大鼠等动物转基因成功, 所以转基因动物技术被公认是遗传学中继连锁分析、体细胞遗传和基因克隆之后的第四代技术, 被列为生物学发展史上126年中第14个转折点。利用转基因动物可以生产药用蛋白, 目前在家畜中表达的药用蛋白基本都是在转基因羊中获得的。研究转基因动物另外一个重要目标, 是培育具有更优良性状的转基因动物, 因此在培育吃得少、生长快、脂肪少的畜禽方面无疑有巨大潜力。科学家已培育出了转基因兔、鸡、羊、猪和鱼等。尽管成就不菲, 但进一步的研究过程中还存在着一些障碍。例如, 有些动物性状如瘦肉型或产奶多的控制基因不止一个, 而是多个。为了控制一个性状, 需导入几个基因, 仅是寻找这些基因就是一项十分艰巨的任务。

1983年世界首例转基因烟草的成功, 标志着人类利用转基因技术改良作物的开始。国际上获得转基因植株的植物已达100种以上, 涵盖农作物、林果、蔬菜、花卉等。1986年以后, 转基因作物产业化迅速发展, 已有100多个转基因作物批准上市, 2002年全球种植面积达到 $5\ 870 \times 10^4$ hm, 涉及

[收稿日期] 2005-03-24; **修回日期** 2005-05-18

[作者简介] 王瑞库(1962-), 男, 山东东平县人, 硕士, 济南市农业高新技术开发区研究员; 从事农业生物技术、全息生物学理论与应用研究

16 个国家。转基因植物的性状，主要是抗除草剂类，其次为 Bt 抗虫类型，再次是双价抗病类、抗病毒类等。转基因植物研究取得了突破性进展。

当前的转基因工程方案，必须分离到目的基因，或者通过蛋白质氨基酸顺序等线索，分析清楚基因中的碱基排列顺序，以便人工合成目的基因。但转移的基因往往是控制简单性状的单基因，而获得多基因，是十分困难的。众所周知，生物的多数性状，尤其是农作物的产量、品质性状，受多基因控制。要改良这些数量性状，仅靠改变其中的某个或少数基因是很难奏效的，必须同时对控制性状的多个编码基因，甚至调控基因进行遗传转化，并使它们在转基因植株及其后代中稳定地表达和遗传，才能达到预期的目的。显然，用目前的技术方法，获得多个目的基因，再逐个地导入多个编码基因及调控基因的做法是十分困难的。

无论动物还是植物，目前的基因工程分离基因技术方法对获得简单的基因有效，对转移多基因比较困难，使受多基因控制的性状改良受到限制。

2 全息胚学说与全息胚基因工程的理论基础

由张颖清教授创立的全息胚学说和全息生物学，认为全息胚是生物体新的统一的结构和功能单位，是作为生物体组成部分的处于某个发育阶段的特化胚胎^[1,2]。生物体是由处于不同发育阶段和具有不同特化的多重全息胚组成。众多的全息胚可以分属于不同层次。生物整体——这个 1 级全息胚由 2 级全息胚组成，2 级全息胚又由 3 级全息胚组成……。一个全息胚不仅是相对独立的自主发育单位，同时还是以上级别的各同系全息胚以及整体的执行特定功能的特化了的结构和功能单位。一个全息胚的一个部位的细胞，既有其自主发育决定的特有特化，又有以上级别的多个全息胚决定的共有特化，从而一个细胞或全息胚具有多重特化态。

全息胚受基因控制，控制一个全息胚发育的基因组合，张颖清称为子基因组^[3]。子基因组可以在一条染色体上，也可以分布在不同的染色体上。细胞具有 n 重特化态，基因组中相应具有 n 个子基因组。细胞内子基因组数量越多或子基因组完全程度越高，则相应生物体的 DNA 含量越高，全息胚的级别越多，发育程度高，反映生物外观表现为形态上的巨大性、寿命长。因此，通过子基因组重复或

扩增，可以增加全息胚的发育层次和性状的表现程度。自然界中的多倍体、多年生植物都有较高的发育程度，是子基因组重复或扩增的结果。

在全息胚的一个部位，基因组中的所有基因并不全表现高的活性。一些基因表现较高的活性，而另一些基因却在某种程度上被抑制，全息胚某一部位所有处于高活性状态的基因的总和称为高活性基因组合^[3]。生物体某一部位特定性状即特化性状是这一部位高活性基因组合表达的结果。如果在生物体某一部位、某一发育时期选材（种子、芽眼、插条、接穗、组织、细胞）作种，与这一部位高活性基因组合相对应的 cDNA 返接发生作用，基因的复本较多地返接到细胞基因组中，基因表达的性状就会在后代的总体性状中有较强的表现。因此，在全息胚的某一部位、某一时期选种，可以提高产量，改进品质，这项技术已在农业应用，取得显著的经济效益和社会效益。

在上述理论框架下，全息生物学建立了一套新的转基因方案。

3 全息胚基因工程的技术原理

人类在长期的农业生产实践中，对生物体某部位的性状形成一定的要求，这个部位的性状就是期望性状。控制期望性状的基因是多基因的组合，这些基因可能在一条染色体上连锁，也可能不在一条染色体上，情况比较复杂。从成千上万个基因中分离出所需要的期望性状基因组合，难度可想而知。在全息胚定域选种法和全息胚定时选种法的基本思想和基因重组技术的基础上，张颖清教授提出了强化期望性状基因组合工程概念和方案，这是新的全息胚基因工程^[4]。技术原理是：在生物体的期望性状表现最强的部位和最佳发育阶段，期望性状基因组合有着最强的表达。在这一部位分离出与期望性状基因组合互补的期望性状 mRNA 组合，并在体外反向转录出与期望性状 mRNA 组合互补的 cDNA 组合，再将 cDNA 组合扩增，增加期望性状基因组合的拷贝数，然后把基因转移到受体中进行表达，在新生的转基因动物或植物中，期望性状就会有十分强烈的表现。根据这一原理，强化期望性状转基因组合工程方案的基本步骤是：

第一，明确需要强化的期望性状。如马铃薯要提高薯块产量，甜菜要提高块根含糖量，小麦、玉米、水稻要提高子粒的产量，奶牛要提高产奶量，

猪提高瘦肉率，……。

第二，找出最佳取材部位和取材时期。根据全息胚定域选种方法和全息胚定时选种方法，确定最佳取材部位和取材时期。

第三，分离和纯化期望性状 mRNA 组合。利用现代的 mRNA 分离技术，得到其粗提物，再除去其中的非期望性状 mRNA，即得到纯的期望性状 mRNA 组合。

第四，由期望性状 mRNA 组合反向转录 cDNA 组合，并进行基因修饰，获得活性。制备 cDNA 文库的技术已比较成熟，如 RNA 酶 H 法等。

第五，cDNA 组合拷贝放大。采用 PCR 技术或其他的基因克隆技术，使 cDNA 组合反复扩增到一定拷贝数。

第六，多拷贝 cDNA 组合的转移。用显微注射法、载体法、电转移法等，将 cDNA 组合多拷贝转移到受体细胞中，并在适宜的条件下发育成个体。

第七，新生个体性状评价。在标准条件下评价转基因组合的表现效果，对综合性状优良并期望性状有最强表现的个体进一步扩繁，迅速扩大群体数量，作为新品种推广。

4 全息胚基因工程的技术关键和需要解决的问题

建立在新生物学理论基础上的新的基因工程方案，应用时必须解决好几个关键技术环节和问题。

第一，确定最佳选材部位与最佳选材时间。通过几年的理论和实践研究，人们基本上确定了主要作物的关于产量期望性状的选择部位和选择时间，用这样的部位和生育时期的种子作种，可以提高产量，改善品质，已被生产推广应用。但关于作物的蛋白质、脂肪、糖分、生育期及动物的产奶量等生理、生化性状的选择方法，研究还少，并且不同性状的选材部位和时间有所不同，性状之间又存在着相关性，从而给选材带来较大的困难。关于主要作物的全息胚基因工程选材部位和选材时间，应根据生物的形态特征、生理生化特性，结合全息生物学原理进行确定。例如，玉米产量性状的选择部位是果穗中部，选择时间是乳线消失期；水稻，产量性状为果穗上部，在腊熟末期选择；小麦产量性状选择部位为麦穗中部的小穗的中基部子粒，在腊熟末期选择；大豆产量性状选择部位是主径中部的荚果的中位子粒，在黄熟期选择；马铃薯产量性状的选

择部位在块茎区的下部区的块茎的顶芽的主芽的上部细胞，选择时间是夏甘薯在地温降到 18 ~ 12℃ 的“霜降”前期；甜菜含糖量性状选择部位是根体的中下部细胞，选择时间是 10 月份；油菜产量性状的选择部位是主径中部的荚果的中部子粒，选择时间是终花期 25 ~ 30 d。

选种方法是选择到某一部位，但部位的范围太广，不可能获得比较准确的期望性状 mRNA 组合，要继续缩小范围，最好选到组织或细胞级别。对选择时间的确定，时间区域越窄，性状表达的时间越确定，选择的效果就越好。如棉花期望性状是提高纤维产量和质量，应选取中部枝上的中部铃的中部棉子近合点端的突起的生毛细胞，并且，应在开花后的 15 ~ 20 d 取材。也就是说，这一部位的细胞在这一时期，期望性状 mRNA 组合有着最强的表现。在这一时期，生毛细胞在伸长和干物质增长方面都处于最佳状态。桑蚕期望性状是多产丝，丝素由丝腺分泌的，从整体看，丝腺位于整体的后部，丝腺的后部有腺细胞，因此，这个腺细胞应是期望性状表现最强的选择部位。选择时间应是五龄后期，因为 70% 的丝是在这个时期吐出的。目前人们对选择方法有了初步认识，但还不深入。

第二，准确分离期望性状 mRNA 组合是关键的技术环节。从期望性状部位提取的 mRNA 组合，不全是期望性状 mRNA 组合，总有部分背景或本底 mRNA 组合，通过强化选择部位和选择时间，可以从总的 mRNA 组合中增加期望性状 mRNA 组合的数量，达到最大程度的纯化。将粗提到的期望性状 mRNA 组合与非期望性状部位 mRNA 组合进行对比，它们间相同的部分是本底 mRNA 组合，可以除去。分离的方法，可以用凝胶电泳法，根据被测物迁移速率判定本底与非本底部分。通过这些程序，就可以从众多的 mRNA 组合中，较精量地分离出期望性状 mRNA 组合，以其做模版，合成期望性状 cDNA 组合，这种 cDNA 组合才有应用意义。

第三，保证期望性状 cDNA 组合的活性。期望性状基因组合所转录的期望性状 mRNA 组合，转录之后有一个加工过程，即去内含子、甲基化等。但分离到的期望性状 mRNA 组合，不全是被加工过的，必然有部分未被加工，而由这部分期望性状 mRNA 组合反向转录来的 cDNA 组合，仍然具有活性。即使被加工过的期望性状 mRNA 组合，在制备出 cDNA 组合后，通过加启动子、连接、切割等必

要的遗传修饰,也能使其获得转录活性。

第四,期望性状 cDNA 组合的遗传转化。把目的基因转入受体细胞,在植物常用农杆菌介导转化和基因枪导入两种方法。前者对双子叶植物比较成功,对单子叶植物比较难,可能是基因转移中的主导限制因素。要建立广泛适应性的遗传转化体系,才能使这项技术应用于绝大多数的植物种类。

第五,期望性状 cDNA 组合在受体中的表达。期望性状 cDNA 组合经过多次拷贝,分子变得很大,进入受体染色体后,基因自身的结构、插入的位置、外源基因和内源基因的协调等都影响到基因的表达、调控和稳定性遗传。

5 全息胚基因工程技术分析与应用展望

全息胚基因工程技术建立在全息胚学说基础之上,研究问题的思路是逆向思维,研究路线是从基因表达结果中找出目的基因,经过多倍化操作,然后按正常基因转化程序操作,这些环节以现有的技术水平是可以解决的。从理论上分析,关键技术解决后,这项技术具有被实施的可能性。从现实来看,人类在转移小基因方面,已经积累了相当丰富的经验,积累了比较成熟的技术,在植物、动物和微生物上获得了很大成功,从而为全息胚基因工程技术的实施奠定了基础。

全息胚基因工程实际是不必要知道基因组中基因种类和数量,仅是根据期望性状表达最强的部位和时间这样的线索,分离得到期望性状 mRNA 组合,并进行反向转录出 cDNA 组合,然后使多拷贝

cDNA 组合在细胞中表达,其效果使期望性状有非常强的表现。所以,全息胚基因工程是对某一性状定向的、快速的和显著的强化变异,对任何有经济价值的农作物、林果、花卉、畜禽等都有强烈的改良作用,加速其向人类要求的方向进化。同一种生物的强化期望性状基因工程,相当于某一物种的定向的、快速的和显著的强化某种性状的进化;异物种之间的强化期望性状基因工程,相当于 2 个物种之间的定向的、快速的和显著的使某种期望性状得到强化的杂交。全息胚基因工程将给人类带来极大的利益。它可以使人类需要的性状得到很大程度的加强,21 世纪将是基因工程大发展的时代,也是全息胚基因工程武装农业的时代,在生物改良和人类食品需求方面,有着广阔的发展前景。

参考文献

- [1] 张颖清. 全息生物学研究 [M]. 济南: 山东大学出版社, 1985. 1~21
- [2] 张颖清. 全息生物学(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989. 1~23
- [3] 张颖清. 全息胚学说基础上的子基因组理论及分子生物学和遗传学若干疑难问题的解决 [A]. 第一届国际全息生物学学术讨论会文集(中文版)[C]. 北京: 高等教育出版社: 1990. 81~90, 118~120
- [4] 张颖清. 新生物观 [M]. 青岛: 青岛出版社, 1991. 156~168
- [5] 王瑞库. 全息农学原理与应用 [J]. 中国农业科技导报, 2004, 5: 36~41
- [6] 王瑞库. 植物叶相全息分析技术 [J]. 农业系统科学与综合研究, 2004, 20(4): 309~312

Solution to Present Gene Engineering with ECIWO Theory —— Techniques of Acquiring Polygene and Intensifying Anticipant Characters

Wang Ruiku

(Jinan Administration Committee of Agricultural High and New Development Zone, Jinan 250002, China)

[Abstract] ECIWO Theory is an important discovery. It gives a brand-new view on biology. ECIWO Theory can solve some problems in gene transfer, which opens a new path to biological genetic operation. The paper discussed the theoretical basis and technical principle of ECIWO gene engineering, which is based on ECIWO Theory, analyzed essence and key of the technology, brought forward operation scheme, and described the future of its application.

[Key words] ECIWO; gene engineering; solution; acquiring polygene; intensifying anticipant characters